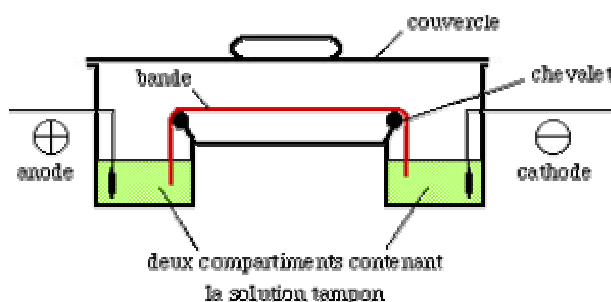


Fiche laboratoire

Séparation des hémoglobines A et S par électrophorèse

Principes de l'électrophorèse des protéines

L'électrophorèse est une méthode d'analyse ou de fractionnement des protéines sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines sont déposées sur une bande d'acétate de cellulose plongeant à chaque extrémité dans un bac rempli de solution tampon. Une tension continue est appliquée à 2 électrodes plongeant chacune dans un des bacs de tampon. Une protéine migrera sur son support d'autant plus rapidement que sa charge globale nette est élevée et que sa taille est réduite. Les tampons utilisés ont un pH basique afin que les protéines se chargent négativement, et migrent vers l'anode.



Dans le cas des hémoglobines A et S ...

Les hémoglobines A et S ne diffèrent que par 1 acide aminé de la chaîne β globine (constituée de 147 AA) : la différence de migration est si faible. Le radical R des deux acides aminés est pour HbA, GLU ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$) et pour HbS, VAL ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$). Malgré une masse molaire légèrement plus importante, l'HbA migre plus vite que l'HbS vers l'anode en raison de la présence d'une fonction COOH supplémentaire dans l'AA GLU ($-\text{COOH} \rightarrow -\text{COO}^- + \text{H}^+$).



Les électrophorogrammes obtenus peuvent être révélés par un colorant des protéines, tel que le rouge ponceau. Dans le cas des hémoglobines, naturellement colorées en rouge, cette dernière opération n'est pas indispensable.

Informations techniques

Matériel : cuve à électrophorèse, générateur de tension, micropipette 5-10 μL , pinces (pour la manipulation des bandes), récipients pour les différents bains (bacs plastiques).

Consommables : bandes d'acétate de cellulose, papier absorbant, embouts pour micropipette, microtubes pour les solutions d'Hb.

Réactifs

- 100 μL d'HbA et d'HbS à 2,5 mg/mL dans du tampon à électrophorèse.
- 1 L de tampon à électrophorèse : par exemple du tampon tris-véronal pH 8,6-9,2
- 1 L de solution de transparaïsation : acide acétique à 5%
- 100mL de colorant rouge ponceau : 1g de rouge ponceau dans 100 mL d'acide acétique à 1%

La conservation des bandes d'acétate de cellulose se fait dans du méthanol 35 %.

Le tampon et le colorant sont récupérables.

A préparer juste avant le TP ...

- Placer 15' les bandes d'électrophorèse, dans un bain de tampon à électrophorèse puis les sécher sur une feuille de papier absorbant.
- Disposer les bandes d'acétate de cellulose sur leur support dans la cuve à électrophorèse. Les extrémités de la bande plongent dans le tampon. La face absorbante des bandes (surface mate) est placée vers le haut. Eviter de poser les doigts sur la bande.
- Remplir la cuve à électrophorèse de tampon. Suivre les consignes du constructeur pour sa mise en service.
- Disposer dans des récipients à la taille des bandes utilisées, le colorant et 4 bains d'acide acétique.

L'activité pratique des élèves

- La cuve à électrophorèse n'étant pas alimentée, déposer au moyen d'une micropipette, 5 à 10 μL de chaque solution d'hémoglobine, côté cathode, perpendiculairement à l'axe de la bande.
- Couvrir la cuve à électrophorèse et brancher le générateur, réglé sur 200V (voir mode d'emploi de chaque générateur).
- Laisser migrer 1 h.
- Débrancher le générateur. Retirer les bandes en les manipulant au moyen d'une pince.
- Révéler les bandes par bains successifs : 5' dans le colorant puis 4 fois 2' dans l'acide acétique 5%.
- Observer les résultats en plaçant la bande d'électrophorèse sur une plaque de verre.

Durée de la manipulation : préparation 20', dépôts 10', migration 60', révélation et lecture des résultats 15'.